聚合酶鏈鎖反應(PCR)
於瓜類病毒偵測之應用

◎鳳山熱帶園藝試驗分所　李文立 王德男

植物病毒病害為台灣最難防治的病害之一，主要原因是缺乏抗病與耐病之育種材料，而且本省土地面積較狹窄，缺乏適當的隔離緩衝及台灣氣候溫暖使病原寄主植物與媒介昆蟲終年存在，造成植物病毒病害的嚴重危害。病毒病害的防治首重預防，去除傳播媒介及拔除病株為重要的防治方法。因此，早期正確而快速的病毒診斷在病害管理中扮演著非常重要且決定性的角色。

甜瓜(*Cucumis melon* L.)及西瓜(*Citrullus lanatus* Matsum.et Nakai.)為本省重要之瓜果類作物，由於栽培面積廣泛，植物病毒病害危害也相對的嚴重。在危害本省瓜類的病毒中以：木瓜輪點病毒－西瓜系統(papaya ringspot virus-watermelon type, PRV-W)，矮南瓜嵌紋病毒(zucchini yellow mosaic virus, ZYMV)，胡瓜嵌紋病毒(cucumber mosaic virus, CMV)，胡瓜綠斑嵌紋病毒(cucumber green mottle mosaic virus, CGMMV)等四種較為嚴重，其中又以感染ZYMV的比例最高，其次為PRV-W，這兩種病毒是國內目前感染瓜類最主要的病毒，得病植株會因為病毒的大量繁殖致使植物體發育不良、產量減低，嚴重時更會使生育停頓、果實畸形，甚至植株枯死，致使生產者損失慘重。

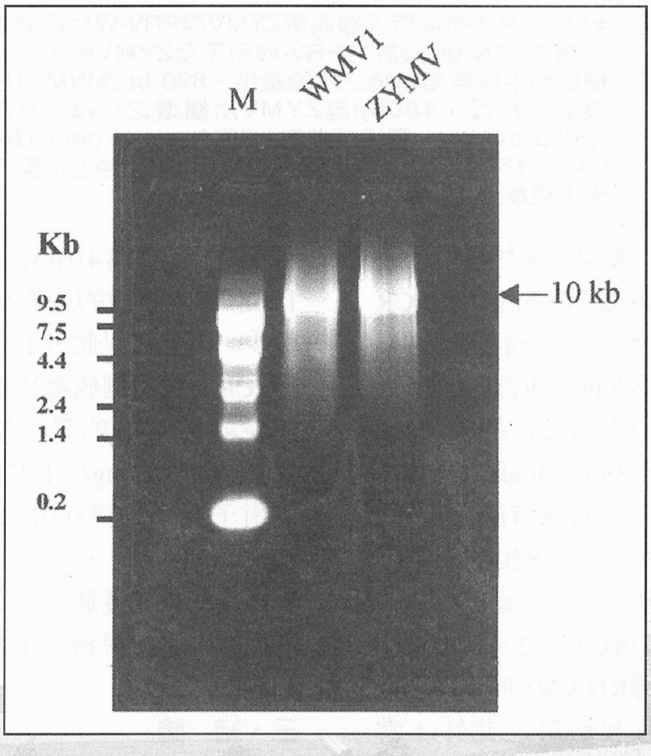
傳統對於感染病毒病的植物均使用指示植物鑑定法或利用病毒抗血清之血清學診斷法－結合抗體檢定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)，往往因為有植物本身所產生的背景值干擾(Chia, 1992)及所需花費時間人力較多的缺點。聚合酶鏈鎖反應法(polymorease chain reaction, PCR)近年來開始被應用於植物病毒的檢測，由於此技術可以將欲檢測的病毒核酸片段重複複製，因此濃度甚低的病毒也可以被偵測出來，同時應用此項技術可以無限制的複製特定的DNA片段以提供DNA雜合反應所需之探針(probe)，供做檢測，這是現階段極為靈敏的病毒診斷方法。

一、PCR技術的原理與方法

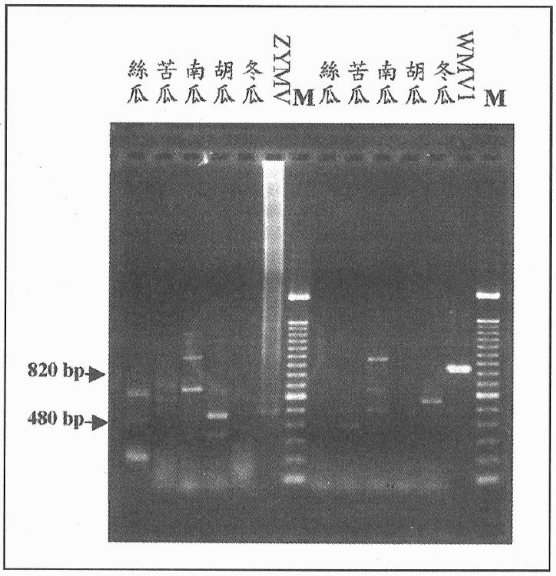
從1985年以來PCR(polymerase chain reaction) 技術已經廣泛的被許多試驗室所採用並且發展出廣泛的應用領域。PCR的操作只要有少量的DNA樣品加上一些單股寡核酸引子(oligonucleotide primers)，去氧核醣三磷酸(deoxynucleotide triphosphates, dNTP)，可以耐受高溫之*Taq* DNA聚合(thermostable *Taq* DNA polymerase)，及穩定的鹽類溶液，在反覆的加熱及冷卻過程後，擴增複製DNA的數量就可以簡易的被電泳技術檢測出來，由於PCR技術的發展，致使以往因爲DNA檢體不足而無法進行偵測的缺點得以改正，致使在DNA操作技術上又邁進一大步，由於在PCR反應中每一次的循環均能使DNA的量成級數增加，亦即在第二次循環時DNA的量是初始DNA量的兩倍，而至三十五次循環時則爲十億倍。因此，PCR技術可以從微量至一根毛髮，一些血液中所取得的DNA來進行法醫學上的鑑定工作，由此可以看出PCR技術擴增DNA的能力。

二、PCR在病毒偵測上之應用

利用PCR等核酸層次的檢測方法進行植物病毒的偵測，同樣也是利用PCR對於核酸分子的擴增能力使極微量的病毒分子可以被檢測出來，在以WMV2外鞘蛋白基因的部分片段序列設計的DNA核酸引子M26 5' TCT AAG CAA GAT GAA TTT AA及M08 5' TAC TTC CAA AAC ACC AAA TA，以此兩股不同序列的專一性DNA引子作爲DNA擴增複製的起點，以擴增病毒外鞘蛋白的特定序列來證明病毒分子是否存在植物體內，也就是受檢測的植物體是否已經被病毒感染的證明(圖一，圖二)。



圖一、WMV1及ZYMV RNA電泳圖譜
病毒RNA以6M glyoxal處理並於65℃ denature以1%的agarose、50伏特電壓、1X TAE緩衝系統進行電泳40分鐘後以EthBr進行染色並於紫外燈下觀察。



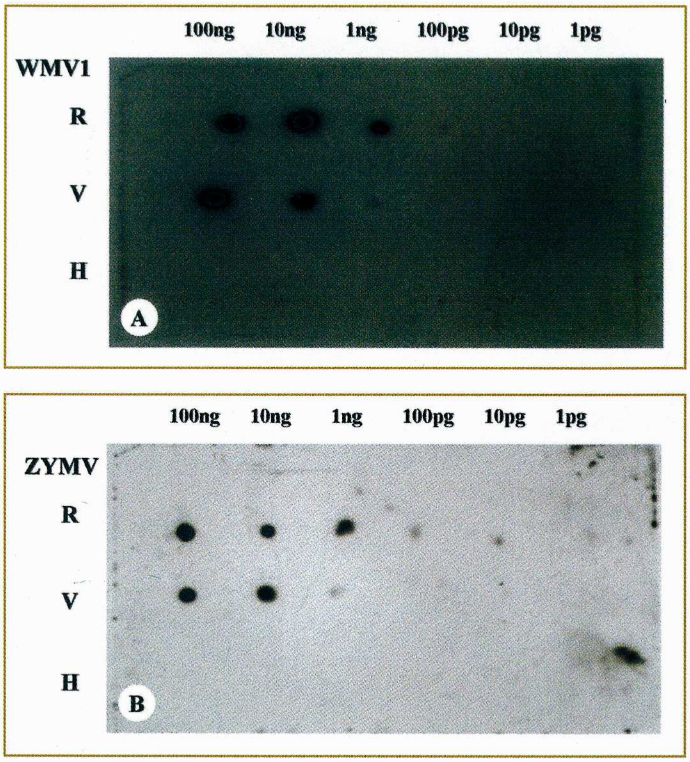
圖二、利用PCR技術進行瓜類病毒ZYMV與PRV-W片段偵測以病毒cDNA所設計之PRV-W引子及ZYMV引子在五種瓜類中均無相對應之片段產生。820 bp為WMV1所擴增之片段，480bp為ZYMV所擴增之片段，M為100bp marker。電泳條件為1.5%Agarose gel，TBE buffer 150V 90min電泳完成後以EthBr染色並於紫外光下觀察。

當以上述核酸引子進行病毒偵測的逆轉錄PCR反應時，若病毒RNA模板爲20pg/μl(每C.C含2×10^{-14}克病毒核酸分子)以上至8ng/μl(每C.C含8×10^{-12}克病毒核酸分子)時，可以得到820bp的鞘蛋白基因片段；低於0.2 pg/μl(每C.C含2×10^{-16}克的病毒RNA量)則無法擴增出任何條帶。此外，當DNA引子濃度爲0.1μM～10pM的濃度時可以產生專一性高的條帶，但是當引子濃度爲40pM及10pM時所擴增的產物量較少，因此在以此引子進行PCR反應檢測病毒時應該使病毒RNA的量維持在20pg/μl至8ng/μl之間，引子濃度維持在0.1μM～40pM之間，並以55℃作爲鍊合溫度進行35次的循環，可以得到良好的結果。

三、結　論

以專一性的核酸引子進行PCR反應可以快速有效的偵測到病毒分子的存在，具有省時快速的功能，對於檢測樣品的敏感度可以達到20pg/μl，遠較酵素鏈結反應敏感，操作方法及步驟簡便。此外，PCR所擴增的cDNA可以再進一步應用非放射性標定及DNA雜合技術，使螢光受質在X光底片上顯影，對於偵測病毒RNA量更可以微量到10pg/μl，敏感度更高(圖三)。

組織轉印法是將植物組織直接壓印在轉漬膜上作爲供試樣品的檢測方法。原本應用於酵素結合抗體檢定法，但是由於植物組織所含的酚類化合物氧化後也會使硝化纖維膜呈色，可能造成誤判或干擾。若是將組織轉印法將植物組織液轉印到消化纖維膜上並結合DNA雜合反應來偵測病毒就可以將干擾的情形消除。另外，組織轉印法的應用對於病毒的偵測相當方便，特別是對田間工作者最爲方便有效，只要將供試樣品的汁液直接點漬或壓印到轉漬膜或尼龍膜上寄回試驗單位進行測試即可，方法簡便，可以節省許多採樣的時間(圖四)。



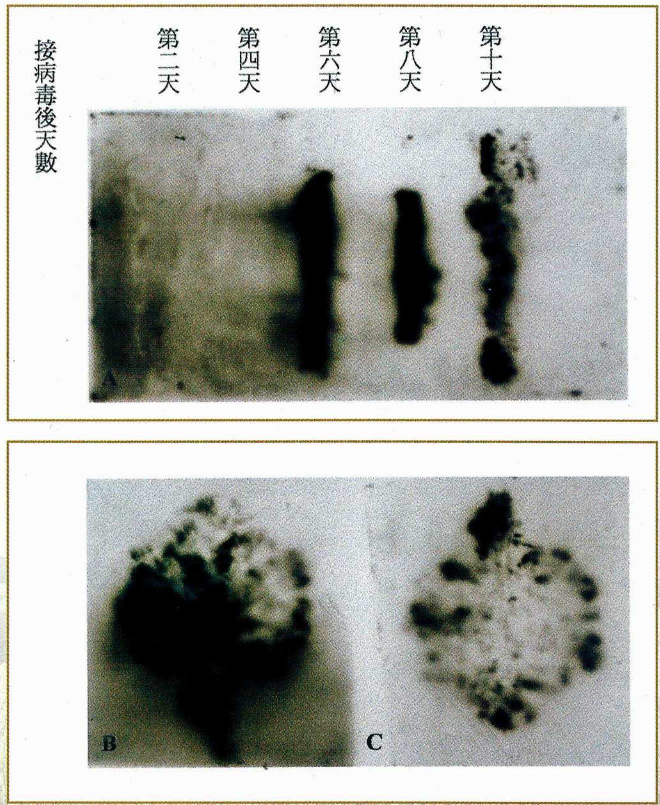
圖三、利用反轉錄－聚合酵素反應產生之核酸探針進行DNA雜合反應

將病毒及病毒RNA用健康植株汁液稀釋成100ng 10ng 1ng 100pg 10pg 1pg各種不同濃度並以cDNA探針進行雜合反應敏感測試，結果顯示純化後的病毒RNA敏感度較高可以偵測到1ng(10^{-9} g)而未純化的病毒可以偵測到10ng的病毒，健康葉片則無任何墨點產生。

V: Virus particle

R: Virus RNA

H: Health leaf



圖四、利用病毒蛋白外鞘部分片段cDNA作為探針直接轉印壓片雜合反應結果

A.為田間接種病毒後第六天可以在植物新生葉片橫切面觀察有明顯反應。

B.病毒分子在整個感病植株葉片之分布

C.葉片背面病毒分布情形。